

氏 名 じょ きゅうしょう  
徐 久翔 XU JIUXIANG

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 262 号

学位授与年月日 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
東西統合医学 専攻

学 位 論 文 題 目  
Shikonin induces apoptosis via p38 and anti-tumor effect  
in 4T1 murine mammary cancer cells  
(シコニン は 4T1 マウス乳がん細胞に対して p38 を介した  
アポトーシスおよび抗腫瘍効果を誘導する)

#### 論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	將積	日出夫
(副査)	教 授	服部	裕一
(副査)	教 授	稲寺	秀邦
(副査)	教 授	長島	久
(指導教員)	教 授	嶋田	豊

# 論文内容の要旨

## 【目的】

乳がんは女性の最も一般的ながんであり、新たな抗がん剤の開発が期待されている。最近、アポトーシス誘導可能な天然物由来の化合物が、抗がん剤の候補化合物として再び見直されてきている。一方で、シコニン<sup>1</sup>は、伝統医薬品に用いられている生薬由来のナフトキノンの誘導体化合物であり、これまでに、抗腫瘍、抗菌、抗血栓作用などの種々の薬理効果が知られている。従って、抗がん剤の新たな候補化合物を見いだすために、本研究は、(1) *in vitro* 実験において、シコニンの 4T1 細胞（マウス乳がん細胞株）に対するアポトーシス誘導の分子機序を解明し、さらに、(2) *in vivo* 実験において、シコニンの抗腫瘍効果を確認することを目的とした。

## 【方法】

- (1) *in vitro* 実験：4T1 細胞に対して、シコニンによる細胞増殖の抑制、酵素であるカスパーゼ 3/7 の活性化、および p38 ならびに JNK の活性化（リン酸化）を、それぞれ、MTT 法の変法である CCK-8 アッセイ、蛍光標識基質の分解測定、およびウェスタンブロッティングアッセイにより確認した。さらに、アポトーシスシグナル経路の関連分子である p38 の阻害剤である SB203580 ならびに JNK の阻害剤である SP600125 を上記の実験に供した。
- (2) *in vivo* 実験：4T1 細胞の懸濁液を BALB/c マウス（メス、6 週齢）の乳房に同所性に移植した。その後、シコニンおよびコントロール（DMSO）を一日おきに腹腔内投与し、投与後 13 日目まで経日的に腫瘍の大きさを測定した。また、最終日にマウスを犠牲死させ、腫瘍を摘出後にその重量を測定した。

## 【結果と考察】

本研究において初めに、シコニンを 4T1 細胞に作用させた結果、濃度依存的な顕著な細胞増殖抑制が確認された。そこで、この抑制効果がアポトーシスによるのか否かを決定するために、次にカスパーゼ-3/7 の酵素活性化を検討した。その結果、シコニンの濃度に依存して、コントロールに比べて有意な酵素活性の亢進が確認され、また、その活性化はカスパーゼの阻害剤の前処理により低下した。これまでに、カスパーゼ-3/7 は、アポトーシスの最終段階を担う実行分

子（酵素）であることが知られている。従って、これまでの結果から、シコニンは一カスパーゼの酵素活性を亢進させることでアポトーシスによる細胞死を誘導し、4T1 細胞の増殖を抑制することが示唆された。一方で、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）によるシグナル伝達経路は、その関連分子で構成される ERK 経路、p38 経路、および JNK 経路が知られており、これらシグナルは、主にリン酸化を介して下流の分子に伝達されることが明らかとなっている。特に、JNK および p38 経路は、紫外線、抗がん剤、酸化、および低酸素などによる各種ストレス下における細胞増殖および細胞死を制御するのに重要な役割を果たすことが広く示されている。そこで本研究では、次に、MAPK 関連分子のなかで、JNK および p38 に着目して、シコニンによる 4T1 細胞のアポトーシス経路の解明を行った。先に述べたシコニンの添加により 4T1 細胞のアポトーシスの指標である一カスパーゼ-3/7 の酵素活性が亢進するが、この活性は、SB203580 の前処理により低下したが、SP600125 ではその低下は明確ではなかった。また、シコニンを作用させた 4T1 細胞において、p38 の活性化の指標であるリン酸化 p38（p-p38）の誘導が確認されたが、JNK のリン酸化（p-JNK）の誘導は確認されなかった。さらに、この p-p38 の発現は SB203580 により低下したが、SP600125 では p-JNK の発現はわずかに低下したのみだった。従って、これらの結果をふまえて、シコニンは主に、p38 シグナル伝達経路を介して 4T1 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。シコニンは 4T1 細胞にアポトーシスを誘導する知見を得たことから、本研究では最後に、4T1 細胞の同所性マウスモデルに対するシコニンの抗腫瘍効果の検討を行った。4T1 細胞を移植後、一日おきにシコニンを腹腔内投与した結果、投与後 7 日目から実験最終日の 13 日目まで、コントロール群と比べて、有意な増殖抑制効果が観察された。さらに 13 日目において、腫瘍重量もコントロール群と比べて、有意に減少していた。これらの結果から、*in vivo* においても、シコニンは顕著な抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。

## 【結論】

本研究においては、シコニンは p38 経路を介して一カスパーゼ 3/7 依存性のアポトーシスを誘導すること、さらに、同所性マウスモデルにおける 4T1 細胞の増殖を顕著に抑制することが明らかとなった。従って、本研究から、シコニンは、乳がんの治療における新規抗がん剤の候補化合物となり得ることが示唆された。

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

## 【目的】

シコニンは無ラサキ科の植物であるムラサキ（紫、*Lithospermum erythrorhizon*）の根（紫紺 シコン）に含まれる赤色のナフトキノン系の化合物で、生薬として抗炎症作用、創傷治癒促進作用、殺菌作用などがあり古くより漢方方剤に配合されてきた。近年、シコンに抗腫瘍効果があることが注目され、培養細胞を使った実験で様々な種類のがん細胞の増殖を抑え、アポトーシスを誘導する作用があることが報告されている。しかしながら、乳がん細胞における作用機序については未だ不明である。そこで本研究では、マウス乳がん由来4T1細胞を用いてシコニンの4T1細胞に対するアポトーシス誘導に関する分子機構の解明を行った。さらに、シコニンの乳がん細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

## 【方法】

- 1) シコニンの4T1細胞に対するアポトーシス誘導に関する実験（in vitro実験）  
シコニンの細胞増殖抑制は、シコニン濃度を変化させた溶液で4T1細胞を培養し、Cell Viability Kit (Cell Counting Kit-8アッセイ) で調べた。アポトーシス誘導については、シコニン濃度を変化させ培養した4T1細胞の抽出液内のカスパーゼ3/7活性を蛍光アッセイで測定した。シコニンの分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MARK）関連分子であるp38およびJNKの影響については、それぞれの阻害薬で前処理した4T1細胞抽出液内のカスパーゼ3/7活性を測定した。さらに、シコニンによるp38およびJNKの活性化をWestern blot法で検討した。
- 2) シコニンの4T1細胞に対する抗腫瘍効果に関する実験（in vivo実験）  
4T1細胞  $1 \times 10^5$  個を含んだ懸濁液を左乳房に移植した BALB/cマウス（メス、6週齢）に対してシコニンを移植後1日～11日まで腹腔内に隔日投与し、腫瘍径を測定した。移植後13日目に腫瘍を摘出し重量を測定した。

## 【結果】

シコニンにより4T1細胞の細胞増殖は濃度依存性に抑制された。アポトーシスの最終段階を担う実行分子（酵素）であるカスパーゼ3/7活性はアポトーシスのシコニンの濃度に依存して亢進し、阻害剤処理で低下した。シコニンによるカスパーゼ3/7活性の亢進はp38の阻害剤の前処理により低下するが、JNKの前処理では低下がみられなかった。さらにシコニンを作用させた4T1細胞においてp38活性化の指標であるリン酸化p38の誘導がみられたが、JNKのリン酸化の誘導はみられなかった。

シコニンの抗腫瘍縮小体積は投与開始後7日目から認められ、投与後13日目の腫瘍重量も有意に減少していた。

## 【総括】

本研究により、徐 久翔君は、マウスの乳がん細胞においてシコニンの抗腫瘍効果とアポトーシス誘導に関する分子機構について初めて検討を行った。その結果、生体へのシコニン投与により腫瘍体積、重量とも減少しており、抗腫瘍効果があることを証明した。さらに、シコニンは抗がん剤などのストレス下における細胞死を制御するMARK経路の1つであるp38経路の誘導していることを明らかとした。また、シコニンがアポトーシスの最終段階を担う実行分子であるカスパーゼ3/7の活性化を観察した。これらの結果から、シコニンは主にp38経路を介してp38を活性化して乳がん細胞にアポトーシスをおこしている可能性を初めて示した点は医学における重要性があると判断される。本研究によりシコニンの抗腫瘍効果が乳がん治療にも応用できる可能性が示唆された。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。